

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

[<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩のカニクイザルにおける反復投与時の薬物動態予備試験

#### 3.2 試験番号

B141136

#### 3.3 試験目的

[<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩を雄性カニクイザルに1回/1週間の頻度で4回反復静脈内投与したときの放射能の血液及び血漿中濃度推移，組織移行性並びに代謝物組成について予備的に検討する。また，単回投与における放射能の残留性及び代謝物組成についても予備的に検討する。

#### 3.4 適用ガイドライン

なし

#### 3.5 適用 GLP

なし

#### 3.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸1番1

委託責任者：桑田 一夫

TEL：058-230-6143, FAX：058-230-6144

#### 3.7 試験受託者

株式会社L S I メディエンス

〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号

#### 3.8 試験施設

株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山14番地1

#### 3.9 試験責任者

中井 弘司

株式会社L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター 分析代謝研究部

TEL：0479-46-5392, FAX：0479-46-3173

E-mail：Nakai.Hiroshi@ma.medience.co.jp

### 3.10 分担責任者

代謝物分析：後藤 優知

### 3.11 主な試験従事者

動物の飼育管理：朝日 啓介，大塚 康之，有田 孝幸，上田 智哉

投与液調製及び分析：佐藤 智洋，伊藤 まゆみ

投与：有田 孝幸，大塚 康之，朝日 啓介，上田 智哉，福田 康成

試料採取及び放射能測定：朝日 啓介，福田 康成，大塚 康之，有田 孝幸

代謝物分析：向後 克哉

### 3.12 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は試験終了後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

### 3.13 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 被験物質に関する資料
- (3) 使用動物に関する資料
- (4) 試験操作に関する資料
- (5) 試験結果に関する資料
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 最終報告書

### 3.14 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（試験研究センター指針）」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認（承認番号：2015-0010）を得た。

4. 試験責任者署名

表題：  $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩のカニクイザルにおける反復投与時の薬物動態予備試験

試験番号：B141136

試験責任者：

2015年 3月 18日

中井 弘司

中井 弘司

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部

## 5. 要約

[<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩を雄性カニクイザルに 1 mg/kg (フリー体換算) の用量を 1 回/1 週間の頻度で 4 回反復静脈内投与したときの放射能の血液及び血漿中濃度推移, 組織移行性並びに代謝物組成について予備的に検討した. また, 1 mg/kg (フリー体換算) の用量で単回静脈内投与したときの放射能の残留性及び代謝物組成についても予備的に検討した.

血液中放射能濃度は反復投与により上昇し, 4 回目投与後 5 分値及び 168 時間値は, 初回投与時のそれぞれ 1.1 及び 2.3 倍となった. 血漿中放射能濃度も血液中放射能濃度と同様に反復投与により上昇し, 4 回目投与後 5 分値及び 168 時間値は, 初回投与時のそれぞれ 1.5 及び 2.1 倍となった. 2, 3 及び 4 回投与後の放射能濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-t</sub>) は, 血液については初回投与時のそれぞれ 1.7, 1.8 及び 2.3 倍に増加し, 血漿については初回投与時のそれぞれ 1.6, 2.0 及び 2.1 倍に増加した. 一方, 消失半減期 (t<sub>1/2</sub>) は投与回数増加に伴う大きな変動はなかった.

大部分の組織において, 放射能濃度は血漿中放射能濃度よりも高く, 特に, 脾臓, 腸間膜リンパ, 副腎及び肺では顕著に高い濃度の放射能が認められ, [<sup>14</sup>C]P092 及び/又はその代謝物は組織移行性が高いことが示唆された. また, 単回投与後 28 日においても, 脳脊髄液を除く全ての組織に放射能が検出され, [<sup>14</sup>C]P092 及び/又はその代謝物の組織からの消失は緩徐であると考えられた.

血液 (3 及び 4 回投与後 1 及び 24 時間) 並びに大脳 (単回投与後 28 日及び 4 回投与後 168 時間) から抽出した放射能を HPLC にて分析した結果, いずれにおいてもラジオクロマトグラム上, P092 がほぼ単一ピークとして検出され, 血液及び大脳中の放射能の主要成分は P092 未変化体であることが示唆された. なお, 単回投与後 28 日及び 4 回投与後 168 時間の大脳中 P092 濃度は, それぞれ 62.5 ng eq./g (0.124 nmol/g) 及び 276.6 ng eq./g (0.550 nmol/g) と算出された.

## 6. 材料及び方法

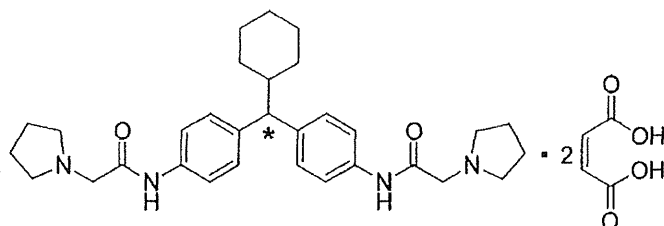
### 6.1 被験物質

#### 6.1.1 標識化合物

##### 6.1.1.1 名称

[<sup>14</sup>C]P092 maleate ([<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩)

##### 6.1.1.2 構造式及び標識位置



\* : <sup>14</sup>C 標識位置

##### 6.1.1.3 分子量

736.70 (at this specific activity)

##### 6.1.1.4 ロット番号

K0348-02

##### 6.1.1.5 化学的純度

99.5% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

##### 6.1.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg, フリー体として 4.288 MBq/mg)

##### 6.1.1.7 放射化学的純度

98.9% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

##### 6.1.1.8 性状

エタノール溶液

##### 6.1.1.9 放射能濃度

5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL)

##### 6.1.1.10 フリー体換算係数

1.4618 (非標識体での分子量比 フリー体 : マレイン酸塩 = 1 : 1.4618)

**6.1.1.11 合成先**

Curachem

**6.1.1.12 保存条件**

冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C以下，実測値：-82.1~-74.8°C），遮光，気密容器

**6.1.1.13 保管場所**

被験物質保管場所（74）

**6.1.1.14 取扱上の注意**

保護メガネ，マスク，ゴム手袋を着用した。

**6.1.1.15 残余被験物質の処理**

残余の被験物質は，関連する薬物動態試験（株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所）で使用することとした。

**6.1.2 非標識化合物****6.1.2.1 名称**

P092・マレイン酸塩

**6.1.2.2 ロット番号**

CMTPG-RQ 及び KS14001

**6.1.2.3 フリー体換算係数**

1.4618

**6.1.2.4 性状**

白色の粉末

**6.1.2.5 提供者**

国立大学法人岐阜大学

**6.1.2.6 保存条件**

冷蔵（許容範囲：1~10°C，実測値：3.0~6.5°C），遮光，密封（窒素封入）

**6.1.2.7 保管場所**

被験物質保管場所（42），（59）及び（29）

### 6.1.2.8 取扱上の注意

保護メガネ、マスク、ゴム手袋を着用した。

### 6.1.2.9 残余被験物質の処理

残余の被験物質は、関連する薬物動態試験（株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所）で使用することとした。

### 6.1.3 特記事項

本試験ではロット番号 KS14001 は直接使用せず、P092・マレイン酸塩標準溶液（別試験で調製）として使用した（6.4.4 項参照）。

## 6.2 媒体

### 6.2.1 名称

生理食塩液（日本薬局方，大塚製薬工場，Lot No. K4G99）

## 6.3 主な試薬

水は、超純水製造システム（Elix-UV 10, Milli-Q Advantage, メルク）で精製したものを精製水として用いた。試薬は、用途に応じて市販の一級品，試薬特級又は同等以上のものを使用した。

## 6.4 投与液

### 6.4.1 調製濃度

2 mg/4.288 MBq/mL（フリー体として）

### 6.4.2 調製方法

投与液は、以下の手順で各投与日に調製した（合計4回調製）。

調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行い、可能な限り滅菌あるいは消毒済みの器材を使用した。

- (1) [<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩を①5.1 mL 及び②3.4 mL（フリー体としてそれぞれ 6.0 及び 4.0 mg）分取し、窒素気流下で乾固させた。
- (2) P092・マレイン酸塩を正確に秤量した（①8.8 mg 及び②5.8 mg，フリー体としてそれぞれ 6.0 及び 4.0 mg）。
- (3) 媒体を①6 mL 及び②4 mL 加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させた。
- (4) 0.22 µm フィルター（MILLEX<sup>®</sup>-GV, メルク(旧社名 Millipore)）でろ過した。
- (5) 投与液の一部を分取し、pH を測定して記録した（実測値：pH 4.270～4.301）。
- (6) 使用後の投与液は冷蔵（許容範囲：1～10°C）条件下で保存し、試験終了時まで廃棄した。

### 6.4.3 放射能濃度の測定

全ロットの投与液について、投与後に 6.10 項において放射能濃度を測定した。放射能濃度の平均値が設定濃度の 90.0～110.0%の範囲内であること並びに測定時の変動係数 (CV) が 5.0% 以下であることを確認した。

### 6.4.4 放射化学的純度の確認

4 回目調製ロットの投与液について、調製日に放射化学的純度を測定した。

投与液の一部 (50  $\mu$ L, n=1) を採取し、380  $\mu$ L のアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈したのち、以下の HPLC 分析条件により測定した (n = 1)。このサンプルのラジオクロマトグラムと P092・マレイン酸塩標準溶液 (0.1 mg/mL) を同条件の HPLC で測定したときの UV クロマトグラムを比較して、 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩の保持時間 (Rt) が P092・マレイン酸塩の Rt に相当することを確認した。なお、P092・マレイン酸塩標準溶液は、「 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩をカニクイザルに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度、排泄及び分布 (試験番号 B130899, 株式会社 L S I メディエンス)」で調製し、冷蔵 (許容範囲: 1～10°C, 実測値: 2.0～5.0°C) 条件下で保存したものを使用した。

HPLC 測定で得られたラジオクロマトグラムにおける全ピーク面積に対する  $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩ピークの割合を放射化学的純度として求めた。

HPLC 測定において、シンチレーションカクテルを含む全溶出液を回収し、その一部について 6.10 項に従い放射能を測定した。この溶出液中の放射能と、注入した試料中の放射能 (6.10 項において測定) の値を用いて、次式により HPLC システムからの放射能の回収率 (HPLC 回収率) を求めた。

$$\text{HPLC 回収率 (\%)} = \frac{\text{溶出液中放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{溶出液全量 (g)}}{\text{注入試料中放射能 (dpm)}} \times 100$$

#### 【HPLC 条件】

ラジオ HPLC システム	L-2000 シリーズ (日立ハイテクノロジー) Radiomatic 625TR (PerkinElmer)
分析カラム	Inertsil ODS-2, 5 $\mu$ m, 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm (ジーエルサイエンス)
カラム温度	40°C
移動相	A = 0.2% Trifluoroacetic acid (TFA) Water B = Acetonitrile
グラジエントプログラム	Time (min) 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
Injection volume	10 $\mu$ L
分析時間	60 分
流速	1.0 mL/min



検出	UV 254 nm 放射能 (液体シンチレーションシステム) セル容量 : 0.5 mL シンチレーションカクテル : Flo-Scint II (PerkinElmer) シンチレーションカクテル流速 : 3.0 mL/min 積算時間 : 6 秒
----	--

## 6.5 試験動物

### 6.5.1 動物種

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

### 6.5.2 選択の理由

本化合物の薬理及び安全性試験にも使用されており、試験結果の相互理解と解釈に有益なため。

### 6.5.3 購入先

日本医科学動物資材研究所

### 6.5.4 仕出国

ベトナム社会主義共和国 (生産業者 : NAFOVANNY)

### 6.5.5 使用動物数

雄 2 匹

### 6.5.6 検疫、馴化

1 匹は指定動物 (サル) の検査場所指定施設である当試験施設で、30 日間以上の輸入検疫期間を含めて検疫・馴化を 6 週間以上行い、健康状態が良好であることを確認した動物を本試験へ移管した。

もう 1 匹は指定動物 (サル) の検査場所指定施設であるイブバイオサイエンスにて輸入検疫を終了した動物を購入し、当試験施設にて検疫、馴化を 4 週間以上行い、健康状態が良好であることを確認した動物を本試験へ移管した。

### 6.5.7 動物移管日

2015 年 1 月 19 日

### 6.5.8 環境馴化

動物を移管後、一般状態及び摂餌量を 2 日間以上観察して健康状態が良好であることを確認したのち、出生日の早い順に動物番号を付与し、投与に供した。

**6.5.9 投与開始時年齢**

5 年齢

**6.5.10 投与開始時又は投与時体重**

動物番号	体重 (kg)
01101	4.76
02102	5.48

**6.5.11 動物の個体識別**

動物供給業者による入れ墨番号により個体識別を行った。また、本試験に用いた動物番号との対応表を作成し、管理した。移管後の馴化期間中のケージには、試験番号、移管日、移管時年齢、入れ墨番号、個体番号、ケージ番号、動物種、性別、飼料の種類、馴化期間中である旨を記載したラベルを貼付した。

動物番号付与後のケージには、試験番号、被験物質名、試験項目、投与経路、用量、食餌条件、入れ墨番号、動物種、性別、動物番号、ケージ番号、採取時点を記載したラベルを貼付した。

**6.5.12 瀕死動物の措置**

瀕死動物はいなかった。

**6.6 動物飼育****6.6.1 飼育室**

5132 室

**6.6.2 飼育環境****6.6.2.1 温度**

許容範囲：23.0～29.0℃

実測値：23.6～27.1℃

**6.6.2.2 相対湿度**

許容範囲：35.0～75.0%

実測値：40.7～69.0%

**6.6.2.3 換気**

10～30 回／時間、オールフレッシュエア－供給

**6.6.2.4 照明時間**

12 時間／日 (7:00～19:00) 点灯

消灯時間帯であっても作業時間には点灯した (2015年2月17日).

#### 6.6.2.5 収容動物数

1匹/ケージ

#### 6.6.3 飼育器材

##### 6.6.3.1 ケージ

ステンレス製代謝ケージ (600W × 600D × 620H mm, トキワ科学器械)

##### 6.6.3.2 給餌器

ステンレス製給餌器 (トキワ科学器械) を使用し, 毎日洗浄した.

##### 6.6.3.3 給水瓶

ポリカーボネート製給水瓶 (500 mL, トキワ科学器械) を使用し, 毎日洗浄した.

#### 6.6.4 エンリッチメント

動物福祉向上のために, 玩具 (ステンレス製ミラー) を与えた.

#### 6.6.5 飼料

##### 6.6.5.1 種類

サル用固型飼料, CMK-2 (日本クレア)

##### 6.6.5.2 給餌法

毎日午前中に1匹当たり約100gの飼料を給与し, 翌日に残餌を回収, 廃棄した. 移管日は移管後に給餌した. なお, 給与に際して絶食はしなかった.

##### 6.6.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し, 使用ロット (Lot No. K2084 及び K2094) の残留農薬等の汚染物質濃度が, 試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した.

#### 6.6.6 飲用水

##### 6.6.6.1 種類

5 µm フィルター濾過後, 紫外線照射した水道水

##### 6.6.6.2 給水法

自由摂取とし, 新鮮な飲用水に毎日交換した.

##### 6.6.6.3 分析

水質検査を定期的 (2回/年) に実施し, その分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に

適合していることを確認した。

## 6.7 投与

### 6.7.1 投与経路

静脈内投与

### 6.7.2 投与経路の選択理由

予定臨床投与経路に準じる。

### 6.7.3 投与方法

動物をモンキーチェアー（CL-4535, 日本クレア）に保定し、翼付注射針（25G×3/4", ニプロ）及びディスプレイダブル注射筒（5 mL, テルモ）を用いて、[2 mL/min]/kgの投与速度（約15秒/body）で伏在静脈内に投与した。

なお、動物番号01101は各回投与後15分の採血終了までモンキーチェアーに保定し、以降は代謝ケージに戻した。動物番号02102は投与後速やかに代謝ケージに戻した。

### 6.7.4 投与方法の選択理由

カニクイザルに静脈内投与する方法として一般的に用いられており、被験物質を正確に投与できる。

### 6.7.5 投与回数・期間

動物番号01101：1週間に1回の頻度で4回投与

動物番号02102：単回投与

### 6.7.6 投与用量及びその設定理由

1 mg/2.144 MBq/kg/回（P092フリー体としての用量）

「<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩のカニクイザルにおける単回投与後の薬物動態予備試験（試験番号B130897, 株式会社LSIメディエンス）」における静脈内投与（Bolus）と同用量（1 mg/kg）を設定した。

### 6.7.7 投与液量

0.5 mL/kg/回

投与日に測定した体重に基づいて投与液量を算出した。個体の投与実績量は重量法により算出した（投与前後の投与器材の総重量を測定し、正確な投与量を把握した）。

## 6.8 試験項目及び試料採取

試験項目及び群構成を下表に示す。

試験項目	投与経路	用量 (フリー体として)、 投与液量	投与回数	採取 時点	評価 動物数	動物番号
6.8.1 血液及び血漿中 放射能濃度	IV	1 mg/0.5 mL/kg/回	4 回	-	1	01101
6.8.2 組織中放射能濃度	IV	1 mg/0.5 mL/kg/回	4 回	168 h	1	01101 <sup>*1</sup>
			1 回	28 days (672 h)	1	02102

-: 経時的に試料を採取した。

\*1: 6.8.1 項における最終時点の採血終了後、6.8.2 項に供した。

### 6.8.1 血液及び血漿中放射能濃度

投与後、下記の採取時点毎に無麻酔下において、橈側皮静脈又は大腿静脈から約 0.5 mL 又は約 10 mL (3 回投与後 1 及び 24 時間並びに 4 回投与後 1, 24 及び 168 時間) を採血した。

#### 【採取時点】

各回投与後 5 分, 15 分, 1, 4, 8, 24, 96, 168 時間 (次回投与前)

血液は、採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, ヘパリンナトリウム処理済み, テルモ) に採取, 混合した。放射能測定用試料として血液 100  $\mu$ L ( $n=1$ ) をバイアルに分取して 6.10 項において放射能を測定し, 血液中放射能濃度を求めた。

10 mL 採血した血液については, 約 3 mL を冷凍 ( $-80^{\circ}\text{C}$ , 許容範囲:  $-60^{\circ}\text{C}$  以下) 保存した。残りの血液は遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3,000 rpm  $\times$  10 min, CF7D2, 日立工機) し, 血漿を得た。血漿 100  $\mu$ L ( $n=1$ ) をバイアルに分取して 6.10 項において放射能を測定し, 血漿中放射能濃度を求めた。測定残分の血漿は冷凍 ( $-80^{\circ}\text{C}$ , 許容範囲:  $-60^{\circ}\text{C}$  以下) 保存した。

血液及び血漿は可能な限り保冷下で取り扱った。

血漿分離後の血球は廃棄した。

### 6.8.2 組織中放射能濃度

動物番号 01101 については, 6.8.1 項における所定の採血終了後, 本項に供し, 投与後 168 時間の血液及び血漿中放射能濃度の測定結果を共有した。

動物番号 02102 においては, 所定の採取時点に無麻酔下で, 大腿静脈から約 10 mL を採血した。血液は, 採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, ヘパリンナトリウム処理済み) に採取, 混合した。放射能測定用試料として血液 100  $\mu$ L ( $n=1$ ) をバイアルに分取して 6.10 項において放射能を測定し, 血液中放射能濃度を求めた。約 3 mL の血液を冷凍 ( $-80^{\circ}\text{C}$ , 許容範囲:  $-60^{\circ}\text{C}$  以下) 保存した。

残りの血液は遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3,000 rpm  $\times$  10 min, CF7D2) し, 血漿を得た。血漿 100  $\mu$ L

(n=1)をバイアルに分取して6.10項において放射能を測定し、血漿中放射能濃度を求めた。測定残分の血漿は冷凍(-80°C, 許容範囲:-60°C以下)保存した。

血液及び血漿は可能な限り保冷下で取り扱った。

血漿分離後の血球は廃棄した。

採血終了後、動物はペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル)を20~30 mg/kgの用量で静脈内投与し、全身麻酔下、頸動脈より放血し、安楽死させたのち下記組織を摘出した。

【採取試料】

—	血液	A	肝臓
—	血漿	A	副腎
A	大脳	A	腎臓
A	小脳	A	脾臓
A	延髄	A	膵臓
C	脊髄	A	精巣
—	脳脊髄液	C	皮膚
B	下垂体	C	骨格筋(大腿筋)
A	眼球	C	骨
A	顎下腺	C	白色脂肪(精巣周辺)
C	腸間膜リンパ	C	褐色脂肪(背部)
A	心臓	—	胆汁(胆嚢内)
A	肺		

組織 A：組織の全量を採取し、その一部を放射能測定に供した組織

組織 B：組織の全量を採取し、その全量を放射能測定に供した組織

組織 C：組織の一部を採取し、その一部を放射能測定に供した組織

脳脊髄液はマイジェクター(27G×1/2", 1 mL, テルモ)を用いて採取し、6.10項において放射能を測定して脳脊髄液中放射能濃度を求めた。

胆汁は胆嚢から注射針(21G×1 1/2", テルモ)を装着した注射筒(5 mL, テルモ)を用いて採取し、6.10項において放射能を測定して胆汁中放射能濃度を求めた。

組織は生理食塩液で洗浄し、濾紙片により付着水分を除いた。

採取した試料について6.10項において放射能を測定し、組織中放射能濃度を求めた。

全重量が測定可能な組織(組織 A, B 及び胆汁)については、測定した組織全重量に基づき投与放射能(動物番号 01101 については 4 回投与した合計放射能量)に対する分布率(組織中放射能分布率)を算出した。血液、骨格筋、皮膚及び白色脂肪については、組織全重量をそれぞれ体重の 6.0%[1], 41.4%[1], 9.4%[1]及び 7.8%[1]として組織中放射能分布率を算出した。

大脳、小脳、脳脊髄液、肝臓及び肺の測定残分は冷凍(-80°C, 許容範囲:-60°C以下)保存した。

採取した試料は採取当日に組織重量を測定し、放射能測定試料を調製した。

組織摘出後の屍体及び血漿分離後の血球は廃棄した。

## 6.9 代謝物分析

6.9.1 項に示す分析試料について、代謝物組成をラジオ HPLC により確認した。

### 6.9.1 分析試料

試料	採取項目	備考
血液	6.8.1 項	4 検体 (3 及び 4 回投与後 1 及び 24 時間)
大脳	6.8.2 項	2 検体 (単回投与後 28 日及び 4 回投与後 168 時間)

### 6.9.2 前処理法及び分析条件

分析試料の前処理方法、ラジオ HPLC 条件、標準溶液調製及び結果の表示等、代謝物分析に関する全ての事項については、「<sup>14</sup>C]P092・マレイン酸塩の代謝物組成分析予備試験 (試験番号 B140810, 株式会社 L S I メディエンス)」に準じた。

## 6.10 放射能の測定

tSIE (transformed Spectral Index of External standard) 法によりクエンチング補正を行う液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2300TR, PerkinElmer) を用い、放射能を測定した。測定は各バイアル当たり 5 分間、1 回とし、バックグラウンド値は測定試料と同一のシンチレーションカクテルのみを 5 分間、1 回測定して得られた dpm 値とした。このバックグラウンド値を差し引いてネットのカウント値とした。なお、放射能の検出限界はバックグラウンド値の 2 倍とした。

以下に測定試料調製法を示す。

### 6.10.1 投与液

一部 (50  $\mu$ L, n=3) を分取、秤量し、メタノールで希釈して、50 mL に定容した。希釈液 1 mL をバイアルに分取 (各 n=1) し、シンチレーションカクテル (Clear-Sol I, ナカライテスク) を 5 mL 加えて混合した。

### 6.10.2 放射化学的純度測定用試料

一部 (5  $\mu$ L, n=1) をバイアルに分取し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合した。

### 6.10.3 HPLC 溶出液

#### (1) 放射化学的純度の確認 (6.4.4 項)

全重量を測定し、10 mL (n=1) をバイアルに分取、秤量し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合した。

#### (2) 代謝物分析 (6.9 項)

全重量を測定し、10~15 mL (n=1) をバイアルに分取、秤量し、Ultima-Flo M を 5 mL 加えて混合した。

#### 6.10.4 血液

組織溶解剤（バイオメリット専用組織溶解液，ナカライテスク）を 1 mL 加え，組織溶解装置（バイオメリット，積水メディカル）で約 30 分間処理したのち，シンチレーションカクテル（Hionic-Fluor, PerkinElmer）を 15 mL 加えて混合した。

#### 6.10.5 血漿

約 1 mL の精製水を加えて希釈したのち，Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

#### 6.10.6 脳脊髄液

一部（n = 1）をバイアルに分取，秤量して，Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

#### 6.10.7 胆汁

全重量を測定したのち，一部（n = 1）をバイアルに分取，秤量して，Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

#### 6.10.8 組織 A

組織全重量を測定した。解剖用剪刀により粗砕したのち，約 0.1 g（n = 1）をバイアルに分取，秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え，組織溶解装置で約 30 分間処理したのち，Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

#### 6.10.9 組織 B

バイアルに分取，秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え，組織溶解装置で約 30 分間処理したのち，Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

#### 6.10.10 組織 C

組織の一部を採取した。解剖用剪刀により粗砕したのち，約 0.1 g（n = 1）をバイアルに分取，秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え，組織溶解装置で約 30 分間処理したのち，Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

#### 6.10.11 抽出液及び HPLC 試料（6.9 項）

全重量を測定したのち，一部（n = 1）をバイアルに分取，秤量し，Ultima-Flo M を 5～10 mL 加えて混合した。

#### 6.11 残余試料の取扱い

測定残分の以下の試料は冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C 以下）保存し，血液及び大脳は 6.9 項の代謝物分析に供した。これらの残分については，試験終了までに代謝物検討試料として 2015 年 3 月 18 日に関連する薬物動態試験（試験番号：B150151，株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所）に移管した。

血液（10 mL 採血した時点）：約 3 mL



血漿：残分全量

大脳，小脳，脳脊髄液，肝臓，肺：残分全量

その他の冷凍（-20℃，許容範囲：-40～-15℃）保存した残分についても 2015 年 3 月 18 日に薬物動態試験（試験番号：B150151）に移管した。

## 6.12 コンピュータシステムの使用

血液，血漿及び組織中放射能濃度並びに組織中放射能分布率は，薬物動態試験支援システム ADMESUPPORT Ver. 2.1（富士通）を用いて算出した。

当該システムの試験情報には，群に関する情報，核種に関する情報，動物購入に関する情報，投与に関する情報，採取項目に関する情報及び測定予定に関する情報を登録した。

血液，血漿及び組織中放射能濃度は P092 フリー体換算濃度として算出し，組織中放射能分布率は投与放射能に対する百分率（% of dose）として算出した。

### (1) データのオンライン収集

重量（g）：投与実績重量，組織

放射能測定値（dpm）：血液，血漿，組織

### (2) データのオフライン収集

容量又は重量：投与液（6.4.3 項，g），血液（mL），血漿（mL），体重（g）

放射能測定値（dpm）：投与液（6.4.3 項）

## 6.13 薬物速度論的解析

動物番号 01101 における各回投与後 168 時間までの血液及び血漿中放射能濃度推移を薬物動態解析ソフトウェア Phoenix WinNonlin 6.3（Pharsight Corporation as part of Certara）の Non-compartmental analysis により解析し，以下の薬物動態パラメータを算出した。

### 【薬物動態パラメータ及び算出方法】

薬物動態パラメータ		
最終報告書での表記		WinNonlin での表記
$C_0$	時間 0 に外挿した初期血液，血漿中放射能濃度	C0
$t_{1/2}$	消失半減期	HL_Lambda_z
$AUC_{0-t}$	血液，血漿中放射能濃度－時間曲線下面積	AUClast
$AUC_{0-inf}$	血液，血漿中放射能濃度－時間曲線下面積	AUCINF_obs
$CL_{total}$	全身クリアランス	Cl_obs
$Vd_{ss}$	定常状態の分布容積	Vss_obs
$MRT_{0-inf}$	平均滞留時間	MRTINF_obs

$t_{1/2}$  の計算に使用した時点は，血液及び血漿中放射能濃度推移の結果を基に設定した。

具体的には，WinNonlin で自動設定された区間をそのまま採用した。

## 6.14 試験結果の算出及び表示

試験結果の表示単位，表示桁数は以下の通りとし，表示桁数の 1 桁下で四捨五入して表示し

た. 6.8.2 項において, 血漿中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率 ( $K_p$  値) を Microsoft Excel 2010 (Microsoft) により算出した. 組織中放射能濃度が検出限界値未満 (ND, Not detected) の場合には,  $K_p$  値は算出せず, NC (Not calculated) と表示した.

6.9 項で求めた各放射性ピークの面積百分率 (% Peaks) は, ラジオクロマトグラム解析ソフトウェア FLO-ONE により算出した. その他の値の算出には, Microsoft Excel 2010 を用いた. 各試料中代謝物の定量値は下式(a)~(c)に従って算出した.

(a) 組成比 (% in analysis sample)

$$= \text{面積百分率 (\% Peaks)} \times \text{HPLC 試料への回収率} \times 1/100$$

(b) 未変化体及び代謝物の血液中濃度 (P092 フリー体換算濃度, ng eq./mL)

$$= \text{血液中放射能濃度} \times \text{組成比} \times 1/100$$

(c) 未変化体及び代謝物の大脳中濃度 (P092 フリー体換算濃度, ng eq./g)

$$= \text{大脳中放射能濃度} \times \text{組成比} \times 1/100$$

代謝物番号 (M-No.) が付与されない放射性ピークの定量値はまとめて「Others」として表示した. Others の面積百分率は, M-No. が付与された放射性ピーク (P092 を含む) の合算値を 100% から差し引いて算出した. Others の組成比, 血液及び大脳中濃度は上式(a)~(c)に従って算出した.

試験結果	表示単位	表示桁数
投与液の放射化学的純度		
HPLC 回収率	%	小数点以下 1 桁
投与液の放射能濃度	MBq/mL	小数点以下 3 桁
投与液中放射能濃度の対設定濃度比		
CV	%	小数点以下 1 桁
血液及び血漿中放射能濃度	ng eq./mL	小数点以下 1 桁
組織中放射能濃度	ng eq./g	小数点以下 1 桁
$K_p$ 値	--	小数点以下 2 桁
組織中放射能分布率	% of dose	小数点以下 2 桁
$C_0$	ng eq./mL	小数点以下 1 桁
$t_{1/2}$ , $MRT_{0-inf}$	h	小数点以下 1 桁
$AUC_{0-t}$ , $AUC_{0-inf}$	ng eq.·h/mL	整数
$CL_{total}$	mL/h/kg	整数
$V_{d_{ss}}$	mL/kg	整数
前処理回収率	%	小数点以下 1 桁
代謝物定量値 (組成比)	% in analysis sample	小数点以下 1 桁
代謝物定量値 (未変化体及び代謝物の血液又は大脳中濃度)	ng eq./mL or g	小数点以下 1 桁

## 7. 結果及び考察

### 7.1 投与液の放射能濃度及び均一性

投与液の放射能濃度及び均一性の測定結果を Appendix 1 に示す。

4 回調製した投与液の放射能濃度はいずれも設定濃度の 90.0~110.0%の範囲内であり、設定通りに調製されたことが確認された。また、放射能濃度測定時の変動係数 (CV) は 5.0%以下であり、いずれの投与液も均一であることが確認された。

### 7.2 投与液中 $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩の放射化学的純度

4 回目調製ロットの投与終了後における投与液中 $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩の放射化学的純度の測定結果を Appendix 2 に示す。

放射化学的純度は 95.0%以上であり、かつ HPLC への注入放射能はほぼ完全に回収されたことから、投与液中の $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩は投与終了まで放射化学的に安定であったことが確認された。したがって、同条件で調製した 1~3 回目ロットの投与液中 $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩の投与終了までの安定性も問題なかったと判断した。

### 7.3 血液及び血漿中放射能濃度

$[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩を雄性サルに 1 mg/kg (フリー体換算) の用量を 1 回/1 週間の頻度で 4 回静脈内投与したときの初回, 2, 3 及び 4 回投与後の血液及び血漿中放射能濃度及び薬物動態パラメータを Table 1 に示す。また、初回及び 4 回投与後の血液及び血漿中放射能濃度推移を Figure 1 に示し、初回, 2, 3 及び 4 回投与後の血液中放射能濃度推移を Figure 2 に示す。

初回投与後の血液中放射能濃度は、投与後 5 分に 558.1 ng eq./mL を示したのち、投与後 168 時間では 42.5 ng eq./mL まで低下した。反復投与により血液中放射能濃度は上昇し、4 回目投与後 5 分値及び 168 時間値は、初回投与時のそれぞれ 1.1 及び 2.3 倍となった。

血漿中放射能濃度も血液中放射能濃度と同様に反復投与により上昇し、4 回目投与後 5 分値及び 168 時間値は、初回投与時のそれぞれ 1.5 及び 2.1 倍となった。

2, 3 及び 4 回投与後の放射能濃度-時間曲線下面積 ( $\text{AUC}_{0-t}$ ) は、血液については初回投与時のそれぞれ 1.7, 1.8 及び 2.3 倍に増加し、血漿については初回投与時のそれぞれ 1.6, 2.0 及び 2.1 倍に増加した。一方、消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は投与回数の増加に伴う大きな変動はなく、各回投与後の血液及び血漿中放射能濃度の  $t_{1/2}$  はそれぞれ 145.7~191.4 及び 261.8~580.2 h であった。

### 7.4 組織中放射能濃度

$[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩を雄性サルに 1 mg/kg (フリー体換算) の用量を 1 回/1 週間の頻度で 4 回静脈内投与したときの 4 回投与後 168 時間における組織中放射能濃度及び組織中放射能分布率 (4 回投与した合計放射エネルギーに対する分布率) をそれぞれ Table 2 及び Table 3 に示す。

また、 $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩を雄性サルに 1 mg/kg (フリー体換算) の用量で単回静脈内投与後 28 日 (672 時間) における組織中放射能濃度及び組織中放射能分布率をそれぞれ Table 4

及び Table 5 に示した。

4 回目投与後 168 時間においては、脾臓に最も高い放射能濃度 (57370.8 ng eq./g) が認められ、 $K_p$  値は 731.77 であった。次いで、腸間膜リンパ (34848.9 ng eq./g,  $K_p$  値 444.50)、副腎 (25016.2 ng eq./g,  $K_p$  値 319.08) 及び肺 (24565.6 ng eq./g,  $K_p$  値 313.34) で高い放射能濃度が認められた。大脳中放射能濃度は 463.4 ng eq./g ( $K_p$  値 5.91) であった。小脳、延髄及び脊髄における  $K_p$  値は 3.52~5.31 であり、脳脊髄液中の放射能は検出限界未満 (ND) であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (8.04%) であり、次いで、肝臓 (5.09%)、皮膚 (3.75%) 及び肺 (2.14%) であった。

単回投与後 28 日 (672 時間) においては、腸間膜リンパに最も高い放射能濃度 (6078.2 ng eq./g) が認められ、 $K_p$  値は 392.14 であった。次いで、副腎 (3784.6 ng eq./g,  $K_p$  値 244.17)、脾臓 (3030.6 ng eq./g,  $K_p$  値 195.52)、肺 (2585.8 ng eq./g,  $K_p$  値 166.83) 及び膵臓 (2446.3 ng eq./g,  $K_p$  値 157.83) で高い放射能濃度が認められた。大脳中放射能濃度は 115.9 ng eq./g ( $K_p$  値 7.48) であった。小脳、延髄及び脊髄における  $K_p$  値は 3.16~6.14 であり、脳脊髄液中の放射能は ND であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (3.31%) であり、次いで、肝臓 (1.97%) 及び皮膚 (1.80%) であった。

大部分の組織において、放射能濃度は血漿よりも高く、特に、脾臓、腸間膜リンパ、副腎及び肺では顕著に高い濃度の放射能が認められ、 $[^{14}\text{C}]$ P092 及び/又はその代謝物は組織移行性が高いことが示唆された。また、単回投与後 28 日においても、脳脊髄液を除く全ての組織に放射能が検出され、 $[^{14}\text{C}]$ P092 及び/又はその代謝物の組織からの消失は緩徐であると考えられた。

## 7.5 代謝物分析

### 7.5.1 前処理回収率及びラジオ HPLC 測定での回収率

各試料の前処理回収率を Table 6 に示す。

血液 (3 及び 4 回投与後 1 及び 24 時間) を前処理したとき、溶媒への抽出率は 90.1~100.1%、HPLC 試料への回収率は 89.8~93.7%、ラジオ HPLC で測定したときの回収率は 98.5~107.3% であった。

大脳 (単回投与後 28 日及び 4 回投与後 168 時間) を前処理したとき、溶媒への抽出率はそれぞれ 76.1%及び 84.4%、HPLC 試料への回収率はそれぞれ 61.2%及び 66.0%、回収率はそれぞれ 100.0%及び 98.9%であった。

### 7.5.2 代謝物組成

血液及び大脳における代謝物の定量結果をそれぞれ Table 7 及び Table 8 に示す。また各試料におけるラジオクロマトグラムをそれぞれ Figure 3 及び Figure 4 に示す。

#### 7.5.2.1 血液

3 及び 4 回投与後 1 及び 24 時間の血液試料中において、いずれも 3 種 (mBM-1~mBM-3) の放射性ピークが検出された。これらのピークのうち、mBM-3 (P092) が最も大きく、各回